

Qualidade microbiológica de leite humano obtido em banco de leite

Microbiological quality of human milk from a Brazilian milk bank

Álvaro B Serafini, Maria Cláudia D P B André, Márcia A V Rodrigues, André Kipnis, Cynthia O Carvalho, Maria Raquel H Campos, Érica C Monteiro, Fábila Martins e Thiago F N Jubé

Departamento de Microbiologia, Imunologia, Parasitologia e Patologia do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás. Goiânia, GO, Brasil

Descritores

Bancos de leite. Leite humano.
Controle de qualidade.

Resumo

Objetivo

Determinar a prevalência de microrganismos indicadores e potencialmente patogênicos que indicam as condições higiênico-sanitárias das amostras de leite humano ordenhado coletadas em banco de leite.

Métodos

Foram realizadas análises microbiológicas de 338 amostras de leite humano ordenhado, sendo 194 de leite cru e 144, pasteurizado, coletadas em banco de leite humano de um hospital materno infantil de Goiânia, GO. As análises microbiológicas foram realizadas com semeadura em ágar Mc Conkey, de acordo com o tipo de bactéria.

Resultados

No leite cru, verificou-se a presença de *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., bolores e leveduras e *Enterobacteriaceae*. Observou-se que *Staphylococcus aureus* esteve presente em 10 (5,2%) amostras, *Staphylococcus epidermidis* em 28 (14,4%), *Streptococcus* spp. em três (1,6%), bolores e leveduras em 43 (22,2%) e *Enterobacteriaceae* em 49 (25,3%). Das 144 amostras de leite humano ordenhado pasteurizado, detectaram-se *Staphylococcus aureus* em cinco (3,5%), *Staphylococcus epidermidis* em 15 (10,4%), *Staphylococcus lugdenensis* em duas (1,4%), *Streptococcus* spp. em quatro (2,8%), bolores e leveduras em 37 (25,7%) e *Enterobacteriaceae* em nove (6,3%).

Conclusões

Os resultados mostraram um alto grau de contaminação no leite cru. No leite pasteurizado, apesar da eliminação da grande maioria de microrganismos potencialmente patogênicos, a percentagem de bolores e leveduras excedeu a de leite cru, mostrando a necessidade de obtenção de um leite com carga microbiana inicial mais baixa para que a pasteurização seja eficiente no controle microbiológico.

Keywords

Milk banks. Milk, human. Quality control.

Abstract

Objective

The objectives of the present study were to determine the prevalence of potentially pathogenic microorganisms that indicate the hygienic and sanitary conditions of human milk samples collected at a Human Milk Bank.

Methods

Three hundred and thirty eight (338) samples of human milk collected from a milk

Correspondência para/ Correspondence to:

Álvaro Bisol Serafini
Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública
R. Delenda Rezende de Melo, s/n Setor Universitário
74605-050 Goiânia, GO, Brasil
E-mail: abisol@iptsp.ufg.br

Financiado pela Fundação de Apoio à Pesquisa/FUNAPE/UFMG (Processo n. 66.357).
Recebido em 23/1/2002. Reapresentado em 27/6/2003. Aprovado em 3/7/2003.

bank in a maternity in the municipality of Goiânia, in the state of Goiás, Brazil were submitted to microbiological analysis. The latter were plated on McConkey agar according to the type of bacteria. Among the total number of samples collected, 194 consisted of raw milk and the remaining 144 were pasteurized milk.

Results

The presence of Staphylococcus spp., Streptococcus spp., yeasts and molds, and Enterobacteriaceae was verified in the raw milk samples. Staphylococcus aureus were isolated in 10 (5.2%) samples, Staphylococcus epidermidis in 28 (14.4%) samples, Streptococcus spp. in three (1.6%) samples, yeasts and molds in 43 (22.2%) and Enterobacteriaceae in 49 (25.3%) samples. In a hundred and forty four (144) samples which underwent thermal treatment Staphylococcus aureus was detected in five (3.5%) samples, Staphylococcus epidermidis in 15 (10.4%), Staphylococcus lugdenensis in two (1.4%), Streptococcus spp. in four (2.8%), yeasts and molds in 37 (25.7%), and Enterobacteriaceae in nine (6.3%).

Conclusions

Analysis indicated a high degree of contamination in raw human milk, and as for the pasteurized milk, despite elimination of the great majority of potentially pathogenic microorganisms, the percentage of yeasts and molds was higher than in raw milk, demonstrating that a lower degree of initial contamination would be necessary for pasteurization to be an efficient means of microbiological control.

INTRODUÇÃO

As infecções exógenas oriundas do ambiente hospitalar são as que merecem maior atenção dos sanitaristas, pois são provocadas por agentes cuja fonte é o ser humano, como: funcionários, pacientes e visitantes, e também por equipamentos e instrumental.⁵ Como é muito difícil a implantação simultânea de medidas de controle de infecções hospitalares em todos os seus setores, os esforços devem ser concentrados nas áreas de risco, como berçários, serviço de nutrição e os centros cirúrgicos, de esterilização e de terapia intensiva. Desta forma, destaca-se entre esses setores o berçário, devido à contaminação cruzada ou pelo banco de leite, implicando que a veiculação de microrganismos patogênicos ou potencialmente patogênicos possa ser considerada fator de risco microbiológico em potencial. Sabe-se que para os bebês alimentados com leite materno, os primeiros seis meses podem ser a época mais sadia de vida. Este tipo de alimentação preenche perfeitamente suas demandas de nutrição e higiene.²⁴ Porém, os recém-nascidos prematuros não dispõem de forças para sugar o leite materno e têm que ser alimentados por outros métodos. Há ainda o fato de que algumas mães, por algum problema fisiológico ou emocional, não conseguem produzir leite. Por outro lado, pode causar alergia aos recém-nascidos o leite oriundo de animais. Por estes e outros motivos, muitos lactentes são alimentados com leite obtido em bancos de leite humano (BLH), produto de doações voluntárias de mulheres que têm produção excedente.

nhado (LHO) distribuído por esses bancos é um assunto de interesse para a saúde pública, pois as crianças que consumirão este produto têm baixa resistência a infecções neonatais.^{1,2,13,21} O problema mais importante dos BLHs é o controle bacteriológico do leite doado,¹¹ sendo que o consumo de leite humano contaminado pode ser a causa de doenças neonatais.²³

Torna-se importante a obtenção de mais dados epidemiológicos sobre a contaminação bacteriana de leite humano e o desenvolvimento de um trabalho educativo com as mães, enfermeiras, técnicos de enfermagem, nutricionistas, médicos pediatras e intensivistas, conscientizando-os sobre os riscos na preparação e consumo do leite humano.²¹ O presente trabalho tem por objetivo conhecer a prevalência de microrganismos existentes no leite oferecido por bancos de leite humano para subsidiar as autoridades competentes na melhor condução de programas de prevenção de infecções de recém-nascidos.

MÉTODOS

Foram coletadas 338 amostras de leite de um banco de leite humano de um hospital materno infantil de Goiânia, GO, sendo 194 amostras de leite humano cru e 144 pasteurizado. Essas amostras eram remetidas imediatamente acondicionadas, ao Laboratório de Microbiologia de Alimentos do Departamento de Microbiologia do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública de Goiânia, onde se procederam as análises microbiológicas.

A qualidade microbiológica do leite humano orde-

Por se tratar de secreção e da quantidade dispo-

nibilizada para a coleta, as análises microbiológicas foram realizadas segundo Koneman et al¹⁴ (1997) com semeadura inicial em ágar sangue e ágar Mc Conkey e, de acordo com o tipo de bactéria isolada, posterior identificação em meios apropriados. As bactérias pertencentes ao gênero *Staphylococcus* foram testadas para a capacidade de produção de coagulase, resistência à novobiocina. Para os *Streptococcus*, baseado na hemólise, foram realizadas provas de resistência à bacitracina, optoquina e outras provas bioquímicas. Na identificação de Gram-negativos, a triagem era realizada em TAF (tríplice açúcar ferro) e a identificação por provas bioquímicas. Para a análise de bolores e leveduras, utilizou-se a técnica de acordo com a American Public Health Association,²⁵ com semeadura em ágar batata dextrose acidificado com ácido tartárico a 10% até pH 3,5, incubação a 25°C±1 por cinco a sete dias.

RESULTADOS

Das 194 amostras de LHO não pasteurizado, foram isoladas 136 cepas (70,4%) de microrganismos indicadores e/ou potencialmente patogênicos, e das 144 de leite pasteurizado, 73 (50,7%) apresentaram contaminação (Tabela 1).

Nas amostras de LHO cru, foram isoladas três (2,2%) cepas de *Streptococcus* do grupo viridans; 10 (7,35%) *Staphylococcus aureus*; 28 (20,59%) *S. epidermidis* e 49 (36,0%) amostras contaminadas por *Enterobacteriaceae*. Observou-se ainda, 43 (31,6%) amostras de leite cru contaminadas por bolores e leveduras (Tabela 2).

Das 144 amostras de LHO pasteurizado, foram encontradas 73 cepas, sendo duas (2,7%) *Staphylococcus lugdenensis*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus* do grupo viridans; cinco (6,9%) *Staphylococcus aureus*; 15 (20,6%) *S. epidermidis* e 12,3% das amostras foram detectadas *Enterobacteriaceae*. Ainda, 37 (50,7%) amostras mostraram-se positivas para bolores e leveduras (Tabela 2).

DISCUSSÃO

A presença de contaminantes em níveis elevados no LHO cru acarreta a redução do valor biológico

pela utilização de nutrientes do leite pela microbiota contaminante e a diminuição dos fatores de defesa.² Estas situações determinam, na maioria das vezes, a classificação do produto como impróprio para o consumo, tendo em vista a vulnerabilidade da clientela receptora. Além disso, o processo de pasteurização será tanto menos eficiente quanto maior for a carga microbiana do produto. Observa-se que há uma grande lacuna nos critérios para seleção do leite para a pasteurização.

Staphylococcus aureus é encontrado na orofaringe dos seres humanos com prevalência de 35 a 40% e na boca e saliva de 10 a 35%.¹⁰ Sua presença, porém, no leite humano pode ser interpretada como contaminação secundária a partir da pele e fossas nasais, ou por condições higiênicas ou sanitárias insatisfatórias dos utensílios empregados. A maior preocupação quanto à sua presença incide sobre a ocorrência de cepas produtoras de toxinas resistentes à pasteurização.³

Pereira et al¹⁹ (1995) relataram a presença de *Staphylococcus* em todas amostras de leite materno procedentes de 19 mulheres com sintomas de mastite. Das 19 cepas, oito sintetizavam quantidades detectáveis de enterotoxinas, sendo que algumas, além desta capacidade, mostraram-se produtoras da toxina do síndrome do choque tóxico.

Em relação ao leite cru, os presentes resultados são semelhantes aos de Carroll et al⁷ (1979) que observaram *S. aureus* em 13 (6,2%) amostras, das 207 de LHO pesquisados. Outros autores encontraram *Staphylococcus* coagulase positiva nas amostras estudadas: 28,1% (Nikodemuz¹⁶), 29% (Almeida et al¹³), 51,7% (Almeida et al²) e ainda de 7.570 amostras, observaram crescimento bacteriano em 230, sendo 40% destas, *S. aureus*.⁸

Wyatt & Mata²⁶ (1969), em 51 amostras de colostro, detectaram enterobactérias em 18% das amostras, refletindo o baixo nível de higiene pessoal e de condições sanitárias na população, no vilarejo de Santa Maria Cauquí, Guatemala.

Outros autores encontraram *E. coli* em 8,5% de 59 amostras de leite materno,²² em 2% de 44 amostras,⁹ indicando uma contaminação fecal do leite, e de

Tabela 1 - Percentagem de amostras positivas e negativas encontradas no leite humano ordenhado cru e pasteurizado de banco de leite humano em Goiânia, GO.

Microorganismos	LHO não pasteurizado		LHO pasteurizado	
	N	%	N	%
Positivas	136	70,1	73	50,7
Negativas	58	29,9	71	49,3
Total	194	100	144	100

LHO – Leite Humano Ordenhado

Tabela 2 - Distribuição dos resultados das análises microbiológicas das amostras de leite humano ordenhado cru e pasteurizado, coletadas em bancos de leite humano, de 1999 a 2001, em Goiânia, GO.

Microorganismo	LHO não pasteurizado			LHO pasteurizado		
	N	analizadas %	positivas %	N	analizadas %	positivas %
<i>Staphylococcus aureus</i>	10	5,2	7,4	5	3,5	6,9
<i>S. epidermidis</i>	28	14,4	20,6	15	10,4	20,6
<i>S. lugdenensis</i>	-	-	-	2	1,4	2,7
<i>Streptococcus grupo viridans</i>	3	1,6	2,2	2	1,4	2,7
<i>S. pyogenes</i>	-	-	-	2	1,4	2,7
<i>Klebsiella</i> sp	3	1,6	2,2	1	0,7	1,4
<i>K. oxitoca</i>	3	1,6	2,2	1	0,7	1,4
<i>K. rhinoscleromatis</i>	6	3,1	4,4	-	-	-
<i>K. pneumoniae</i>	4	2,1	2,9	2	1,4	2,7
<i>Enterobacter</i> sp	1	0,5	0,7	-	-	-
<i>E. aerogenes</i>	2	1,0	1,5	-	-	-
<i>E. agglomerans</i>	3	1,6	2,2	-	-	-
<i>E. cloacae</i>	12	6,2	8,8	3	2,1	4,1
<i>E. hormaechei</i>	2	1,0	1,5	-	-	-
<i>Escherichia coli</i>	3	1,6	2,2	-	-	-
<i>Citrobacter freundii</i>	1	0,5	0,7	-	-	-
<i>C. diversus</i>	1	0,5	0,7	-	-	-
<i>Morganella morganii</i>	1	0,5	0,7	-	-	-
<i>Serratia marcescens</i>	3	1,6	2,2	-	-	-
<i>S. liquefaciens</i>	-	-	-	1	0,7	1,4
<i>Proteus mirabilis</i>	1	0,5	0,7	1	0,7	1,4
<i>Hafnia alvei</i>	2	1,0	1,5	-	-	-
<i>Pantoea</i> sp.	1	0,5	0,7	-	-	-
<i>Pseudomonas</i> sp.	3	1,6	2,2	1	0,7	1,4
Bolores e leveduras	43	22,2	31,6	37	25,7	50,7
Total: amostras analisadas	194	100	-	144	100	-
Total: amostras positivas	136	70,4	-	73	50,7	-

enterobactérias em 15 (7%).⁷ Os presentes resultados revelaram a presença de enterobactérias em 25,3% das amostras de LHO cru analisadas e ainda em 6,2% do leite após pasteurização. Apresentaram, portanto, qualidade higiênica inferior aos estudos citados.

Entre as enterobactérias, destaca-se a importância da determinação do grupo coliforme no controle da qualidade microbiológica de BLH, pois sua presença pode indicar contaminação, mesmo que indireta, de origem fecal, sem implicar necessariamente a identificação de *E. coli*.² Pesquisas têm mostrado que a contaminação por coliformes pode ser proveniente do ambiente, como estudo feito em 472 amostras, que revelaram 38,4% deste grupo de bactérias,¹⁷ ou de 5.710 amostras de leite humano foram detectados coliformes em 1139 (19,9%)¹⁷ e em 837 amostras, 71 (8,48%) estavam contaminadas com coliformes, porém apenas três por *E. coli*.¹⁸ No presente estudo, os coliformes estiveram presentes em 21,1% das amostras de leite cru e em 5,6% das pasteurizadas, mostrando que a eficiência da pasteurização pode ser comprometida por uma carga microbiana inicial elevada.

A presença de bolores e leveduras em alimentos pode indicar contaminação advinda do meio ambiente ou resultado de manipulação em condições higiênico-sanitárias insatisfatórias.¹⁵ Almeida⁴ (1986) encontrou uma prevalência de fungos e leveduras em 69,4% das amostras obtidas após emprego de méto-

do usual (água e sabão) de higiene da glândula mamária. Já outros pesquisadores observaram 230 (6,5%) amostras com bolores e leveduras de 7.570 analisadas.⁸ Os presentes resultados, de 22% para leite cru, mostraram-se inferiores aos de outros autores,⁴ porém, preocupantes para leite pasteurizado (25,7%), denotando possível contaminação ambiental pós-processamento ou ineficácia da pasteurização. A presença de leveduras patogênicas em LHO pasteurizado sugere que este poderia ser uma fonte de infecção para recém-nascidos durante o aleitamento. O controle de qualidade com o uso da contagem de leveduras em LHO pode ser um bom indicador de problemas na higiene, estocagem ou transporte.²¹

A pasteurização inadequada não é somente um perigo presumível às propriedades benéficas do LHO, mas pode também aumentar a susceptibilidade para subseqüentes contaminações.⁶

A Resolução RDC nº 12, de janeiro de 2001, do Ministério da Saúde¹⁴ estabelece, pela primeira vez no Brasil, critérios para controle microbiológico do leite humano. Nela, a contagem de microrganismos aeróbios mesófilos viáveis permitida é de até 100 UFC/mL, coliformes a 35°C e *Staphylococcus* coagulase positiva ausentes em 1 mL e *Salmonella* sp. ausente em 25 mL. De acordo com essa Resolução, 4,9% das amostras analisadas no presente trabalho estão impróprias para o consumo humano por não apresentarem os parâmetros analíticos de acordo

com o permitido no Anexo I da referida Resolução. Diante dos resultados obtidos, acredita-se que devem haver esforços para melhorar a qualidade microbiológica do LHO, mesmo o que se destina à pasteu-

rização. Para tanto, resultados e medidas mais rigorosas de monitoramento da qualidade do leite humano são imprescindíveis para garantir um alimento seguro para os recém-nascidos.

REFERÊNCIAS

1. Almeida JAG. Brasil perde 180 milhões de litros de leite materno no Rio. *Folha de São Paulo* 12 de maio de 1999; Caderno Cotidiano: 3-5.
2. Almeida JAG, Novak FR, Almeida CHG, Serva VB. Avaliação parcial da flora microbiana do leite humano ordenhado no IMIP. *Rev Inst Mat Inf Pernambuco* 1989;3:13-6.
3. Almeida JAG, Novak FR, Silva IS. Estudo da ocorrência de *Staphylococcus aureus* em amostras de leite humano ordenhado. In: *I Congresso Brasileiro de Bancos de Leite Humano*; 8-12 de julho de 1998. Brasília (DF); 1998. p. 10.
4. Almeida JAG. Qualidade do leite humano coletado e processado em bancos de leite humano [Tese de mestrado]. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa; 1986.
5. Bittencourt BB, Melo CG. A infecção hospitalar e o serviço de nutrição. *Rev Paul Hosp* 1972;20:28-31.
6. Björkstén B, Burman LG, Chatev P, Fredrikzon B, Gothefors L, Hernell O. Collecting and banking human milk: to heat or not to heat? *BMJ* 1980;281:765-9.
7. Carroll L, Davies DP, Osman M, McNeish A. Bacteriological criteria for feeding raw breast-milk to babies on neonatal units. *Lancet* 1979;2:732-3.
8. Colaço W, Serva VB, Lira CS. Perfil microbiológico do leite humano ordenhado, distribuído no banco de leite humano do IMIP, no período de julho/95 a dezembro/99. In: *XII Encontro Nacional de Analista de Alimentos*; 04 a 08 de novembro de 2001. Maceió; 2001. p. 213.
9. Eidelman AI, Szilagyi G. Patterns of bacterial colonization of human milk. *Obstetrics & Gynecology* 1979;53:550-2.
10. Herceg RJ, Peterson LR. Normal flora in health and disease. In: Mandell, Douglas, Bennilt, editors. *Principles and practice of infectious disease*. 3rd ed. New York: Churchill Livingstone; 1990. p. 6-14.
11. Ikonen RS, Miettinen A, Groonos P. Bacteriological quality control in a human milk bank. *Klin Pädiatr* 1982;194:295-7.
12. Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn Jr WC. *Color atlas and textbook of diagnostic microbiology*. 5th ed. Philadelphia: Lippincott; 1997.
13. Law B, Urias B, Lertzman J, Robson D, Romance L. Is ingestion of milk-associated bacteria by premature infants fed raw human milk controlled by routine bacteriologic screening? *J Clin Microbiol* 1989;27:1560-6.
14. Ministério da Saúde. Resolução nº 12/2001 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Regulamento Técnico Sobre Padrões Microbiológicos Para Alimentos. *Diário Oficial da União*. Brasília (DF); 10 de janeiro de 2001.
15. Mislivec PB, Beuchat LR, Cousin MA. Yeasts and molds. In: Vanderzant C, Splittstoesser DF, editors. *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. 3rd ed. Washington (DC): American Public Health Association; 1992. p. 239-49.
16. Nikodemuz I. Microflora in human milk sample. *Nahrung* 1986;30:901-6.
17. Novak FR, Almeida JAG, Almeida CHG. Detecção e identificação de coliformes em leite humano ordenhado. *Rev Inst Mat Inf Pernambuco* 1989;3:17-9.
18. Novak FR, Almeida JAG, Asensi MD, Moraes BA, Rodrigues DP. Resistência antimicrobiana de coliformes isolados de leite humano ordenhado. *Cad Saúde Pública* 2001;17:317-21.
19. Pereira ML, Santos EJ, Sellos I, Bergdoll M. *Staphylococci* in breast milk from women without mastitis. *Rev Microbiol* 1995;26:117-20.
20. Picollo RC, Pimentel EP, Fávero LM, Rizzo MA. Surto de salmonelose ocorrido em cantina escolar, no município de São Paulo, em 1991. *Rev Hig Alimentar* 1992;6:28-30.
21. Rosa CA, Novak FR, Almeida JAG, Hagler LC, Hagler AN. Yeasts from human milk collected in Rio de Janeiro, Brazil. *Rev Microbiol* 1990;21:361-3.
22. Szollosy E, Marjai E, Lanatos J. Bacterial contamination and sparing heat treatment of mother's milk. *Acta Microbiol Acad Sci Hungarian* 1974;21:319-25.
23. Tyson J, Edwards W, Rosenfeld A, Beer A. Collection methods and contamination of bank milk. *Arch Dis Child* 1982;57:396-8.
24. Unicef - Fundo das Nações Unidas para a Infância. Importância do leite materno na infância. *Rev Hig Alimentar* 1984;3:172-3.
25. Vanderzant C, Splittstoesser DF, editors. *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. 3rd ed. Washington (DC): American Public Health Association; 1992.
26. Wyatt RG, Mata LJ. Bacteria in colostrum and milk of Guatemalan Indian Women *J Pediatr* 1969;91:102-7.